

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：奨励研究

研究期間：2021～2021

課題番号：21H04209

研究課題名 ポリコナゾール長期投与によって代謝酵素の自己誘導は起こるのか

研究代表者

小玉 菜央 (Kodama, Nao)

鳥取大学・医学部附属病院・薬剤師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000円

研究成果の概要：本研究の目的はポリコナゾール（VRCZ）長期使用患者の血中VRCZ濃度の低下および血中VNO濃度の上昇が、VRCZの代謝酵素の自己誘導に起因する可能性について検討することである。最もヒト初代肝細胞に近いとされるHepaRG細胞にVRCZを長期間曝露させ、VRCZの代謝に関与する代謝酵素のmRNA発現量を比較した。VRCZ非添加群に比較して10 µg/mLの群ではCYP2C9の発現量が、100 µg/mLの群ではCYP3A4の発現量がそれぞれ経時的に増加した。しかし、VRCZ長期曝露による明らかな発現量増大や濃度依存的な発現量の増大は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VRCZは重症または難治性真菌感染症の治療や造血幹細胞移植での深在性真菌症予防投与において長期間の投与が必要となる。しかし、長期投与されている外来患者では特定薬剤治療管理料の算定ができないため、定期的なTDMが実施されていない。改訂版 抗菌薬TDMガイドラインでは、長期投与症例に対する具体的なTDM実施方法は定まっていない。長期曝露により代謝酵素を自己誘導することが明らかとなれば、長期投与症例において適切なタイミングでのTDMが実施可能となり、VRCZによる真菌症治療の最適化に寄与できると考える。

研究分野：医療薬学

キーワード：ポリコナゾール TDM 自己誘導 長期曝露

## 1. 研究の目的

ポリコナゾール(VRCZ)長期使用患者の血中 VRCZ 濃度の低下および血中 VNO 濃度の上昇が、VRCZ の代謝酵素の自己誘導に起因する可能性について検討する。

## 2. 研究成果

### (1) 研究の背景

抗真菌薬の VRCZ は、効果および有害事象と血中濃度に関連性を認めるため、治療薬物モニタリング(TDM)の実施が推奨されている。2016年に発行された改訂版 抗真菌薬 TDM ガイドラインにおいて、「ルーチンの TDM は推奨されていない」とされている。一方、一般的に定常状態に到達したとされる血漿中 VRCZ 濃度(投与開始5日目以降)と比較して、その後の血中濃度は大きく変動するとの報告もある(*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 1793-1796, 2009、*Cancer*, **109**, 1532-1535, 2007)ことから「長期使用例では TDM 実施が望ましい」と記載するなど、投与量および血中濃度安定後の定期的な TDM の方法について一定の見解が得られていない。また、ブイフェンド®インタビューフォームにおいて、「ヒトにおいてチトクロム P450 (CYP)の誘導は認められていない」との記載があるが、鳥取大学医学部附属病院の VRCZ を長期間使用している患者において、入院後の初回 TDM から1ヶ月間に同じ投与量で、モニタリングの指標である投与前血中濃度(トラフ濃度)が経時的に低下した症例を経験した。さらに、VRCZ の代謝物の N-オキシド体(VNO)を測定したところ、未変化体に対する代謝物の割合が増大(VNO/VRCZ: 2.2 倍 → 7.0 倍)していることが確認された。

そこで、VRCZ を長期間使用した場合、代謝酵素の自己誘導が起こり VRCZ トラフ濃度を低下させている可能性について検討することとした。

### (2) 方法

#### 細胞、培地、培養方法

ヒト肝細胞の特異的機能を発現・維持していることが知られており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態試験などで汎用されている HepaRG 細胞を用いた。HepaRG®凍結バイアル(HPR116)操作手順書に従い、HepaRG 細胞を Medium 670 にて、24 well コラーゲン(タイプI)コートプレートに、 $0.48 \times 10^6$  viable cells/well の細胞密度で播種した。24 時間後より Medium 620 を用いて最大 28 日間培養を継続した。培地中の VRCZ 濃度は 1—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、0.1 (v/v)%メタノールを vehicle 群とした。

#### Real-time PCR による mRNA 解析

NucleoSpin® RNA を用いて、培養後の HepaRG 細胞から total RNA を精製し、得られた total RNA から PrimeScript™ RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。Real-time

表 1 Real time PCR 解析用のプライマー配列

遺伝子名	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
CYP2C9	GAC ATG AAC AAC CCT CAG GAC TTT	TGC TTG TCG TCT CTG TCC CA
CYP2C19	GAA CAC CAA GAA TCG ATG GAC A	TCA GCA GGA GAA GGA GAG CAT A
CYP3A4	CTG TGT GIT TCC AAG AGA AGT TAC	TGC ATC AAT TTC CTC CTG CAG
GAPDH	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG

PCR 用試薬は TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)を用い、解析用プライマーは Kondo らの報告(*PLoS One*, **9**, e104010, 2014)を参考に設計した(表 1)。測定は Thermo Fisher Scientific 社の ViiA™ 7 リアルタイム PCR システムを使用し、CYP の分子種のうち VRCZ の代謝に関与する CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 の mRNA 発現量について Ct 法にて解析した。培養 0

日目（播種後 4 時間）の mRNA 発現量を 1 とし（コントロール群）、補正のためのハウスキーピング遺伝子は GAPDH（Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）を選択した。

### (3) 結果・考察

#### HepaRG 細胞長期培養における代謝酵素の mRNA 発現量の変化（VRCZ 非存在下）

HepaRG 細胞は 28 日間培養が可能であり、全ての培養期間で代謝酵素の発現が認められた。それぞれの相対発現量は、CYP2C9（21 日目 / 3.3 倍）、CYP2C19（21 日目 / 5.9 倍）、CYP3A4（0 日目）で最大であった。CYP2C9 および CYP2C19 の mRNA 発現量は、培養開始 4 日目にピークをむかえその後減少し、再度 21 日目にピークを示した。一方、CYP3A4 の発現量は培養開始時と比べ 0.4—0.8 倍と継続して低値であった。

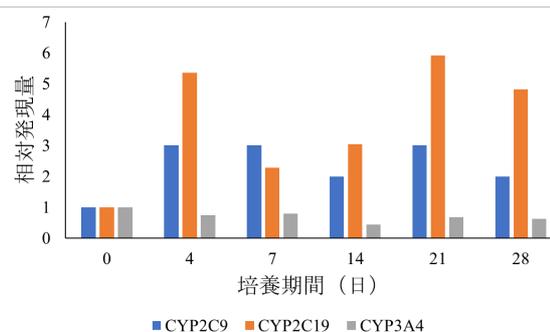


図 1 HepaRG 細胞を長期間培養した場合の mRNA 発現量の変化（ $n=2$  または 3）

#### VRCZ 長期曝露時の代謝酵素の mRNA 発現量の変化（VRCZ 存在下）

各薬物代謝酵素の mRNA 発現量は、vehicle 群（VRCZ 非添加群）および低濃度群（1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）では同じ挙動を示した。10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の群では経時的に CYP2C9 の mRNA 発現量が増加し、高濃度群（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）では経時的に CYP3A4 の mRNA 発現量が増加した。一方、VRCZ 長期培養による明らかな mRNA 発現量の増大や濃度依存的な発現量の増大は認められなかった（図 2）。

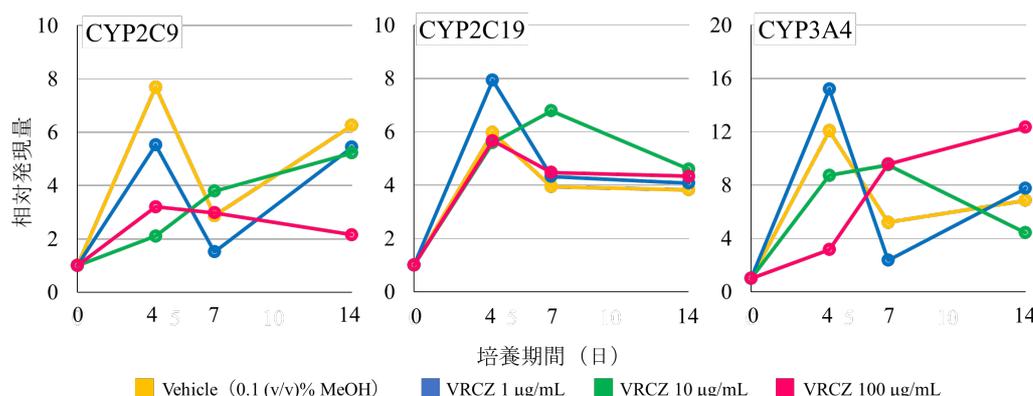


図 2 VRCZ 添加培地で培養した場合の mRNA 発現量の変化（ $n=3$ ）

培地中に dimethyl sulfoxide（DMSO）、コルチコステロイド、血清等を添加すると機能が維持されること、リファンピシンなどの一般的な誘導剤の CYP3A4 誘導効果は最大（転写：50 倍、活性：10 倍）であること（*Drug Metabolism and Disposition*, **38**, 516-525, 2010, *Applied Toxicology*, **34**, 1078-1086, 2014）、また DMSO 自体の代謝誘導能により誘導剤の効果を過小評価してしまう可能性があることが報告されている（*Chemico-Biological Interactions*, **168**, 66-73, 2007）。本検討では長期間の培養が可能な専用培地（Medium 620）を用いたが、その成分は非公開である。培地中に含まれる何らかの成分で誘導が過小評価されている可能性も考えられる。CYP3A4 の誘導効果については今後、培地中の VRCZ と VNO を測定し評価していく。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------